

- 三森経世、佐野統、西本憲弘. 抗環状シトルリン化ペプチド抗体陽性RA患者におけるT細胞の活性化. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. ポスター. 国立京都国際会館. 京都. 2013.4.18-20.
9. 松谷隆治、李穎、村上美帆、關口昌弘、松井聖、北野将康、大村浩一郎、井村嘉孝、藤井隆夫、黒岩孝則、中原英子、前田恵治、村上孝作、川人豊、三森経世、佐野統、西本憲弘. 関節リウマチの治療 生物学的製剤(TNF阻害薬以外) アバタセプト治療は抗環状シトルリン化ペプチド抗体陽性RA患者の活性化T細胞を抑制する. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 口頭発表. 国立京都国際会館. 京都. 2013.4.18-20.
 10. 藤井隆夫、關口昌弘、大村浩一郎、井村嘉孝、橋本求、前田恵治、中原英子、比嘉慎二、黒岩孝則、井川宣、三木健司、吉井一郎、波内俊三、村上孝作、尾本篤志、川人豊、西本憲弘、三森経世、佐野統、ABROAD研究グループ. 関節リウマチの治療 生物学的製剤(TNF阻害薬以外) アバタセプトによる生物学的製剤未治療関節リウマチ患者の寛解導入率とそれに影響を与える因子の検討(ABROAD試験). 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 国立京都国際会館. 京都. 2013.4.18-20.
 11. 吉川卓宏、松井聖、關口昌弘、北野将康、横田章、船内正憲、八田和大、東光久、新名直樹、樋上謙士、尾崎吉郎、日高利彦、竹内孝男、藤本隆、川人豊、藤井隆夫、西本憲弘、三森経世、佐野統、ABROAD研究グループ. 関節リウマチの治療 生物学的製剤(TNF阻害薬以外) 生物学的製剤未治療RA患者に対するBody Mass Index(BMI)とアバタセプト(ABT)の臨床的効果との関連(ABROAD試験の中間解析). 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 国立京都国際会館. 京都. 2013.4.18-20.
 12. 西本憲弘. IL-6阻害による関節リウマチの治療. 平成25年度日本内科学会生涯教育講演会. 大阪国際会議場. 大阪. 2013.5.19
 13. 西本憲弘. IL-6と炎症. 第34回日本炎症・再生医学会. 教育講演. 国立京都国際会館. 京都. 2013.7.2
 14. 西本憲弘. IL-6 阻害による関節リウマチの治療. 平成 25 年度日本内科学会生涯教育講演会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2013. 9. 29
 15. Nishimoto N. Interleukin-6 as a therapeutic target in inflammatory autoimmune diseases. - From rheumatoid arthritis to vasculitis syndromes-. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop2012. Tokyo, conference center. Tokyo, Japan. 2012.3.29
 16. Nishimoto N, Lee HM, Murakami M , Aoki C , Li Y , Matsutani T. Expressions of immune response related genes were normalised after Tocilizumab treatment in rheumatoid arthritis (RA) patients. EULAR 2012. Messe Berlin. Berlin. Germany. 2012.6.6-9.
 17. 松谷隆治. 李 穎. 村上美帆. 李 慧敏. 青木千恵子. 西本憲弘. リンパ球サブセットの解析. 関西関節リウマチセミナー. ヒルトン大阪. 大阪. 2012.1.20
 18. Lee HM, Aoki C, Murakami M, Matsutani T, Nishimoto N . Overexpressions of S100A4/A6/A9/A11/A12 in the patients with RA, SLE, and JIA and correlations of their expression levels with the local and systemic inflammatory biomarkers in RA patients. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第21回国際リウマチシンポジウム. ポスター発表 1. グランドプリンスホテル新高輪. 東京. 2012.4.26-28
 19. Nishimoto N. Advanced therapeutic strategy using anti-IL6 receptor antibody, tocilizumab, in RA. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会・第21回国際リウマチシンポジウム. 第21回国際リウマチシンポジウム 3. グランドプリンスホテル新高輪. 東京. 2012.4.26-28

20. 西本憲弘. 免疫系におけるサイトカインの働きとリウマチ性疾患. 第22回日本小児リウマチ学会総会・学術集会 教育講演. ウィルあいち. 愛知. 2012.10.5-7
21. Nishimoto N. Discovery of IL-6 and its clinical application - The journey from IL-6 to tocilizumab-第41回日本免疫学会学術集会 International Symposium 12 Translational Research in Immunology 第41回日本免疫学会学術集会 シンポジウム. 神戸国際会議場. 2012.12.5-7
22. 川合眞一、西本憲弘. シンポジウム. 日本初の創薬をめざして. わが国の成功例: 抗IL-6受容体抗体、トシリズマブの基礎と臨床開発. 第28回日本医学会総会 2011. 2011.4.8-10
23. 西本憲弘. シンポジウム. 免疫システムの臨床応用: 課題と今後の展望. 抗IL-6受容体抗体による炎症性免疫疾患の治療. 第28回日本医学会総会 2011. 2011.4.8-10
24. 西本憲弘. 炎症性免疫疾患に対するIL-6阻害治療-from bench to bedside-. 第54回日本腎臓学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2011.6.16
25. 西本憲弘. 免疫内科における免疫抑制剤の使い方. スリーサム2011 京都 第45回日本眼炎症学会. 2011.7.8
26. 西本憲弘. シンポジウム. 生物学的製剤の効果から見た成人のRAの炎症病態. 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸ポートピアホテル. 兵庫. 2011.7.18-20
27. 西本憲弘. ランチョンセミナー. 実臨床におけるエタネルセプトの有効な使用法-ケーススタディ: 迷った末の選択-. 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸ポートピアホテル. 兵庫. 2011.7.18-20
28. 和田雅史、李慧敏、青木千恵子、杉野英彦、村上美帆、松谷隆治、越智隆弘、西本憲弘. ワークショップ. RA患者と関節炎を呈するDNase1 KOマウスの骨髄における免疫機能異常の類似性. 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸ポートピアホテル. 兵庫. 2011.7.18-20
29. 杉野英彦、李慧敏、青木千恵子、和田雅史、村上美帆、松谷隆治、越智隆弘、西本憲弘. ワークショップ. 破骨細胞形成におけるs100A4の機能解析. 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸ポートピアホテル. 兵庫. 2011.7.18-20
30. 李慧敏、杉野英彦、青木千恵子、島岡康則、越智健介、越智隆弘、西本憲弘. ワークショップ. 関節リウマチ(RA)の骨髄細胞における免疫関連遺伝子の発現異常. 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会. 神戸ポートピアホテル. 兵庫. 2011.7.18-20
31. 中野直子、森谷夕造、竹本幸司、中野威史、石井榮一、伊藤卓夫、西本憲弘. 家族性高コレステロール血症及び若年性特発性関節炎の治療中に高安動脈炎を発症したシトステロール血症の一例. 第21回日本小児リウマチ学会総会・学術集会. 神戸国際会議場. 兵庫. 2011.10.14-16
32. 松谷隆治、村上美帆、李慧敏、杉野英彦、西本憲弘. 毒性水準下レベルの水銀が誘導する自己抗体産生機構の解明. 第40回日本免疫学会総会・学術集会ワークショップ. 幕張メッセ. 千葉. 2011.11.27-29
33. 北浦一孝、松谷隆治、藤井克樹、白井顕治、鈴木さつき、高崎智彦、小笠原康悦、西本憲弘、倉根一郎、鈴木隆二. 新世界ザルにおけるT細胞受容体β鎖遺伝子のCDR3領域における正の選択. 第40回日本免疫学会総会・学術集会. 幕張メッセ. 千葉. 2011.11.27-29.
34. 西本憲弘. シンポジウム. 臨床薬理と最新治療: リウマチ膠原病. 関節リウマチに対する分子標的治療. 第32回日本臨床薬理学会年会. 2011.12.1
35. 松谷隆治、李穎、村上美帆、松井聖、關口昌弘、藤井隆夫、大村浩一郎、前田恵治、黒岩孝則、入交重雄、井村嘉孝、川人豊、三森経世、佐野統、西本憲弘. ABROAD研究グループ. 生物学的製剤未使用の活動性RA患者におけるT細胞サブセット解析. 第26回日本臨床リウマチ学会. パシフィコ横浜. 神奈川 2011.12.3-4
36. Lee HM, Sugino H, Aoki C, Nishimoto N. Underexpressions of mitochondrial-DNA encoded ATP synthesis-related genes and of DNA repair genes in systemic lupus

- erythematosus. The Asia Pacific League of Association of Rheumatology (APLAR) Symposium 2011, Taipei. 2011.4.15-17
37. Sugino H, Lee HM, Ochi T, Nishimoto N. Suppression of intracellular S100A4 utilizing siRNA inhibits osteoclastogenesis. EULAR2011. London. 2011.5.25-28.
38. Lee HM, Sugino H, Aoki C, Shimaoka Y, Ochi T, Nishimoto N. Comparisons of MHC class I molecule expressions in bone marrow (BM) cells and peripheral blood cells (PBCS) of rheumatoid arthritis (RA). EULAR2011. London. 2011.5.25-28.
39. Matsutani T, Murakami M, Lee HM, Sugino H, Nishimoto N. Subtoxic dose of mercury reduces splenic marginal zone B cells, resulting in the increase in autoantibodies in murine mercury-induced autoimmunity ACR/ARHP 2011. Chicago. USA. 2011.11.5-9.
40. Lee HM, Sugino H, Aoki C, Murakami M, Matsutani T, Ochi T, Nishimoto N. Correlations between S100 gene expression levels and the local and systemic inflammatory markers (matrix metalloproteinase-3, MMP3; erythrocyte sedimentation rate, ESR) in rheumatoid arthritis patients. ACR/ARHP 2011. Chicago. USA. 2011.11.5-9.
41. Nishimoto N, Murakami M, Matsutani T, Hashimoto J, Takagi N. Interleukin-6 as a therapeutic target in locomotor disorders. Bio-Rheumatology International Congress. Tokyo. Japan. 2011.11.14-16.
42. Lee HM, Aoki C, Shimaoka Y, Ochi K, Ochi T, Nishimoto N. Abnormal expressions of immune response-related genes in RA bone marrow cells. Bio-Rheumatology International Congress. Tokyo. Japan. 2011.11.14-16.
43. Lee HM, Sugino H, Aoki C, Umegaki N, Katayama I, Furukawa F, Nishimoto N. Association between SLE patients with or without photosensitivity and the expression of mitochondrial encoded ATP synthesis-related and DNA repair genes. The 5th Autoimmunity Congress Asia (ACA 2011), Singapore, 2011.11.17-19.
44. Murakami M, Matsutani T, Aoki C, Lee HM, Li Y, Nishimoto N. Blocking interleukin-6 signal ameliorates inflammatory manifestations and laboratories of cachexia in a patient with malignant mesothelioma: A case study. The 6th Cachexia Conference. Milan, Italy. 2011,12.8-10.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

特記すべきことなし。

2. 実用新案登録

特記すべきことなし。

3. その他

特記すべきことなし。

関節リウマチの病態を制御する末梢血単球亜分画に関する研究

研究分担者 桑名 正隆 慶應義塾大学リウマチ内科 准教授
研究協力者 金子 祐子 慶應義塾大学リウマチ内科 助教
研究協力者 瀬田 範行 慶應義塾大学リウマチ内科 助教
研究協力者 堀内 行雄 川崎市立川崎病院 病院長
研究協力者 島岡 康則 浜脇整形外科病院 副院長
研究協力者 越智 健介 東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター 助教

研究要旨

関節リウマチ (RA) 病態の中心的役割を担う滑膜細胞、破骨細胞は末梢血単球由来と考えられてきた。末梢血単球には多彩な亜分画が存在し、それぞれが炎症惹起、免疫抑制、組織再生など異なる機能を有する。そこで、RA 患者末梢血、骨髄を用いて CD14+単球亜分画の RA 病態における役割を検討した。末梢血単核球をソーティングして特定の単球分画のフェノタイプ、機能を検討したところ、CD14+CD15+CXCR4^{low} 細胞は TNF α や IL-6 を高発現することで関節内の炎症を惹起するが、CD14+CD15-CXCR4^{high} 細胞は骨芽細胞や軟骨芽細胞への分化能を有して関節の再生を促して保護的に働くことが明らかとなった。また、未治療 RA 患者の前向きコホート (SAKURA) データベースを用いて、診断時の末梢血単球亜分画と疾患活動性やその後の関節破壊進展との関連を追究した。未治療 RA では健常人に比べて CD14+CD16+、CD14+CCR2+単球が増加し、CD14+単球における CXCR4 発現は低下、CCR2 発現は上昇していた。CD14+CCR2+は CRP と正の相関を示し、CD14+CD16+は MRI における骨びらん・骨髄浮腫と関連し、1 年後の関節破壊進行例 (Δ mRSS >0.5 /年) および急速関節破壊進行例 (Δ mRSS ≥ 5 /年) と関連した。二項ロジスティック回帰分析では診断時 CD14+CD16+単球比率のみが関節破壊進行、特に関節裂隙狭小化の進行を予測する独立因子として抽出された。以上より、末梢血単球亜分画はそれぞれが異なる RA 病態と関連していた。これら末梢血単球亜分画のバランスが個々の症例における関節炎の程度や関節破壊の進行度の多様性を制御している可能性がある。末梢血中単球亜分画が予後不良を予測するバイオマーカーとして有用であるとともに、RA の新たな治療標的として注目された。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) は関節滑膜の増殖と炎症により関節破壊をきたす全身性炎症性疾患である。その病態には T 細胞、B 細胞、破骨細胞、滑膜細胞などの多彩な細胞、ケモカイン、サイトカインなどの液性因子の関連が知られている。RA 罹患関節の組織学的特徴であるパンヌスは主に増殖した滑膜細胞、浸潤したマクロファージやリンパ球や形質細胞、

破骨細胞で形成されており、TNF α や IL-1 など様々な炎症性サイトカインを産生する。また、骨浸食には破骨細胞が積極的に関与する。このように RA 病態の中心的役割を担う滑膜細胞、破骨細胞は末梢血単球由来と考えられてきた。腸骨から末梢血に動員される CD14+CD15+単球が重症のムチランス型と関連することが示されているが、末梢血単球の RA 病態への関わりについての報告は少ない。

末梢血単球は抗原提示細胞、炎症細胞の前駆細胞であることが知られているが、多彩な亜分画が存在し、それぞれが炎症惹起、免疫抑制、組織再生など異なる機能を有する。そこで、RA患者末梢血、骨髄を用いてCD14+単球亜分画のRA病態における役割を検討した。

また、未治療RA患者の前向きコホート

(SAKURA) データベースを用いて、診断時の末梢血単球亜分画と疾患活動性やその後の関節破壊進展との関連を追究した。

B. 研究方法

対象

外来通院中のRA患者86名と健常人32名を対象とした。うち9名のRAより同時に骨髄血の提供を受けた。

SAKURAは新規RA患者を対象とした前向きコホートで、平成19年8月より未治療RA患者を連続して登録してきた。登録例のうち、1年以上経過観察し、その間の関節破壊に関するデータが前向きに収集できた75例を対象とした。RA診断時に関節所見、免疫・血清反応を含めた血液検査、関節X線、手関節MRI、骨密度、頸動脈エコー、足関節上腕血圧比を実施し、末梢血を採取した。また、経時的に臨床情報を蓄積している。

フローサイトメトリー

末梢血または骨髄血から比重遠心法で単核球を分離してCD3、CD14、CD15、CD16、CD19、CD29、CD31、CD34、CD144、CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CXCR3、CXCR4、CXCR5、VEGFR1の発現を多重染色後のフローサイトメトリーで解析し、陽性分画の比率または蛍光平均強度(Mean fluorescence intensity: MFI)を求めた。

CXCR4発現レベルによる単球のフェノタイプ・機能解析

フローサイトメーター(FACS CaliburまたはMoFlo™)の細胞分離システムを用いて末梢血からCD14+CD15-CXCR4high細胞とCD14+CD15+CXCR4low細胞を単離した。これら細胞群におけるIL-1 α 、IL-6、IL-8、TNF α 、MCP-1、CCR1、CCR2、CCR5、CX3CR1の発

現を定量的PCRで解析した。遺伝子発現レベルはGDPAHの発現量で補正した。さらに、単球由来多能性細胞の誘導のためにフィブロネクチンをコートした培養プレートでCD14-細胞由来液性因子と共に培養した。培養7日目に付着した紡錘型細胞を単球由来多能性細胞と定義した。

(倫理面への配慮)

本研究は学内倫理委員会で承認済みで、患者本人に対して研究内容を説明し、文書による同意を取った。

C. 研究結果

RA骨髄ではCD14+単球の28-60%にCD15の発現が見られた。CD15発現の有無で層別化するとCD15+単球でCD15-単球と比べてCD34とCCR5の発現が高かった(P<0.05)。同様の傾向は末梢血でもみられたが、統計学的な有意差はなかった。一方、再生能の高い単球由来多能性細胞への分化効率はCXCR4high単球の方がCXCR4low単球に比べて高かった。したがって、単球由来多能性細胞の前駆細胞はCD14+CXCR4high細胞中に濃縮され、末梢血CXCR4high単球は単球由来多能性細胞を介して骨芽細胞や軟骨芽細胞へ分化することで関節の修復に関わる可能性が想定された。RA患者では末梢血単球のCXCR4の発現は健常人より低く、疾患活動性が高いほど低下した。そこで、末梢血CD14+単球のCD15とCXCR4の発現パターンを解析したところ、CXCR4を低発現する単球はCXCR4を高発現する単球より有意にCD15の発現が高く、CD15-単球はCD15+単球より有意にCXCR4の発現が高かった。すなわち、末梢血単球におけるCD15とCXCR4の発現は互いに相反した。そこで、MoFlo™を用いて末梢血単核球からCD14+CD15+CXCR4lowとCD14+CD15-CXCR4highを高率に含む分画を分離し、それらの遺伝子発現プロフィールを比較した。その結果、CD14+CD15+CXCR4lowでTNF α とIL-6、CD14+CD15-CXCR4highでCX3CR1の発現レベルが高かった。

最後にSAKURAコホートに登録された75例

を対象として診断時の末梢血単球分画と疾患活動性やその後の関節破壊進展との関連を追究した。罹病期間 0.6 ± 0.4 年、ステージ I/II が 91%であったが、シャープ変法 (mTSS) による骨破壊は 9.6 ± 20 で早期にもかかわらず関節破壊進行が早い予後不良例を多く含んでいた。

登録時の単球分画を RA75 例と健常人 20 例で比較した。単球分画では、健常人に比べて RA では CD14+CD16+単球の増加 ($P = 0.04$)、CD14+CCR2+単球の増加 ($P < 0.001$) を認めた。また、CD14+単球における CXCR4 発現は低下し ($P = 0.003$)、CCR2 発現は上昇していた ($P < 0.001$)。登録時の活動性指標と末梢血単球分画の関連を調べたところ、CD14+CCR2+は CRP と相関したが ($r = 0.33$, $P = 0.001$)、CD14+CD16+単球比率、CD14+単球における CXCR4 の発現レベルは活動性指標と相関しなかった。

登録時の MRI による関節破壊 (骨びらんまたは骨髄浮腫) の有無と単球分画の関連を調べた。診断時に関節破壊を認めた例では認めなかった例と比較して CD14+CD16+単球比率が高かった ($P = 0.003$) が、他の単球指標との関連はなかった。1 年間に関節破壊の進行 ($\Delta mRSS > 0.5$ /年) を認めた 38 例では、それ以外に比べて有意に CD14+CD16+単球比率が高かった ($P = 0.04$)。特に急速に関節破壊が進行した ($\Delta mRSS \geq 5$ /年) 20 例は、CD14+CD16+単球比率が高かった ($P = 0.01$)。mTSS を関節裂隙狭小化と骨びらんに分けて解析した。関節裂隙狭小化進行例は非進行例に比べて CD14+CD16+比率が高かったが ($P = 0.04$)、骨びらん進行例と非進行例の間で統計学的な有意差はなかった。

最後に関節破壊進行を予測する独立因子を検討した。単変量解析で関節破壊進行を予測する因子を調べると 12 ヶ月後の DAS28 と診断時 CD14+CD16+単球比率が得られた ($P = 0.02$, 0.04)。これら 2 項目に診断までの期間、抗 CCP 抗体、12 ヶ月までの生物学的製剤使用を加えて二項ロジスティック回帰分析を行ったところ、診断時 CD14+CD16+単球比率

のみが関節破壊進行を予測する独立因子として抽出された ($P = 0.02$ 、オッズ比 1.8、95%CI 1.1-2.8)。同様の解析を関節裂隙狭小化、骨びらんの進行で行うと、関節裂隙狭小化の進行を予測する独立因子として診断時 CD14+CD16+単球比率 ($P = 0.03$ 、オッズ比 1.03、95%CI 1.004-1.062)、骨びらん進行を予測する独立因子として 12 ヶ月後の DAS28 が抽出された ($P = 0.01$ 、オッズ比 1.95、95%CI 1.2-3.2)。

D. 考察

RA 病態における単球亜分画と病態への関わりを検討した。その結果、末梢血単球には多様な分画が存在し、それぞれが異なる役割を果たしていることが明らかとなった。CD14+CD15+CXCR4^{low} 細胞は TNF α や IL-6 を高発現することで関節内の炎症を惹起するが、CD14+CD15-CXCR4^{high} 細胞は骨芽細胞や軟骨芽細胞への分化能を有して関節再生に働くことが明らかとなった。また、末梢血 CD14+CD16+単球比率は関節破壊進行の早い予後不良例で増加し、かつ治療導入にもかかわらず関節破壊、特に関節裂隙狭小化の進行と関連する。これら末梢血単球亜分画のバランスが個々の症例における関節炎の程度や関節破壊進行度の多様性を制御している可能性がある。末梢血 CD14+CD15+CXCR4^{low} 細胞比率が炎症、CD14+CD16+単球比率が関節予後不良を予測するバイオマーカーとして有用な可能性が示された。今後、単球分画が関節破壊を誘導する機序のさらなる解明が必要であるが、新たな治療標的としてもきわめて魅力的である。

E. 結論

RA 患者末梢血中単球亜分画のバランスが疾患活動性、関節予後不良と関連した。末梢血単球が RA の新たな治療標的として有望な可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kaneko Y, Kuwana M, Kameda H, and Takeuchi T. Sensitivity and specificity of 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology*. 2011; 50(7): 1268-1274.
2. Seta N, and Kuwana M. Potential involvement of human circulating CD14⁺ monocytes in tissue repair and regeneration. *Inflam. Regen*. 2012; 32(1): 1-7.
3. Hattori H, Suzuki S, Okazaki Y, Suzuki N, and Kuwana M. Intracranial transplantation of monocyte-derived multipotential cells enhances recovery after ischemic stroke in rats. *J. Neurosci. Res*. 2012; 90(2): 479-488.
4. Mitsunaga S, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Homma Y, Narita A, Kashiwase K, Okudaira Y, Inoue T, Kulski JK, and Inoko H. Associations between six classical HLA loci and rheumatoid arthritis: a comprehensive analysis. *Tissue Antigens*. 2012; 80(1): 16-25.
5. Seta N, Okazaki Y, Izumi K, Miyazaki H, Kato T, and Kuwana M. Fibronectin binding is required for human circulating monocytes to acquire the mesenchymal/endothelial differentiation potential. *Clin. Dev. Immunol*. 2012; 2012: 820827.
6. Yamaguchi Y, and Kuwana M. Proangiogenic hematopoietic cells of monocytic origin: roles in vascular regeneration and pathogenic processes of systemic sclerosis. *Histol. Histopathol*. 2013; 28(2): 175-183.
7. Mitsunaga S, Hosomichi K, Okudaira Y, Nakaoka H, Kunii N, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Homma Y, Kashiwase K, Azuma F, Kulski JK, Inoue T, and Inoko H. Exome-sequencing identifies novel rheumatoid arthritis-susceptible variants in the *BTNL2*. *J. Hum. Genet*. 2013; 58(4): 210-215.
8. Seta N, Okazaki Y, Miyazaki H, Kato T, and Kuwana M. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 is required for the

transformation of circulating monocytes into multipotential cells. *PLoS One*. 2013; 8(9): e74246.

2. 学会発表

1. 西本哲也、瀬田範行、金子祐子、桑名正隆、竹内勤: 未治療の日本人関節リウマチ患者における一塩基多型の解析. 第55回日本リウマチ学会総会 (神戸). 2011. 7. (ワークショップ: 関節リウマチの病因・病態 5)
2. Nishimoto T, Seta N, Anan R, Yamamoto T, Kaneko Y, Kuwana M, Takeuchi T: Gene Polymorphisms of STAT4 and TRAF1 Predict Clinical Response to DMARDs in Japanese Patients with RA. The 4th East Asian Group of Rheumatology (Tokyo). 2011. 10.
3. 仁科直、亀田秀人、金子祐子、桑名正隆、竹内勤: 初発関節リウマチに患者に対する non-biological DMARDs 治療と血清サイトカインの変化. 第56回日本リウマチ学会総会 (東京). 2012. 4. (ワークショップ 77: 関節リウマチの治療: DMARDs-NSAIDs1)
4. 瀬田範行、岡崎有佳、越智健介、島岡康則、堀内行雄、竹内勤、桑名正隆: 関節リウマチの骨髄と末梢血 CD14⁺単球のフェノタイプ解析. 第56回日本リウマチ学会総会 (東京). 2012. 4.
5. Nishimoto T, Seta N, Anan R, Yamamoto T, Kaneko Y, Kuwana M, Takeuchi T: A single nucleotide polymorphism of tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 predicts clinical response to anti-tumor necrosis factor treatments in Japanese patients with rheumatoid arthritis. The 76th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Washington, DC). 2012. 11.
6. Nishina N, Kameda H, Kaneko Y, Kuwana M, Takeuchi T: Interleukin-6 as a biomarker for the clinical and radiological effectiveness of methotrexate in rheumatoid arthritis. The 76th Annual Scientific Meeting of American College of

Rheumatology (Washington, DC). 2012. 11.

7. 仁科直、金子祐子、亀田秀人、桑名正隆、竹内勤: 初発関節リウマチ患者に対するメソトレキセート治療で血漿 IL-6 は低下し、治療後 IL-6 は関節破壊のバイオマーカーとなりうる. 第 57 回日本リウマチ学会総会 (京都). 2013. 4. (ワークショップ 39: 関節リウマチの治療: DMARDs-NSAIDs 3)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

1. 桑名正隆、加藤尚志、瀬田範行、宮崎洋: 単球由来多能性細胞 (MOMC) の効率的な作製法、特許第5416895号、2013年11月22日.
2. 桑名正隆、加藤尚志、瀬田範行、宮崎洋: 単球由来多能性細胞 (MOMC) の効率的な作製法 (Method for efficient production of Monocyte-derived multipotent cell (MOMC)), US Patent 8,216,838、2012年7月10日.

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

RA における骨髄造血幹細胞分化異常の解析に関する研究

研究分担者 中畑龍俊

京都大学 iPS 細胞研究所 教授

研究要旨

慢性関節リウマチ (RA) の発症には自然免疫担当細胞が関与していることが知られているため、iPS 細胞を用いた RA 研究には機能的な血球を効率的に分化させることができる分化系が必要である。我々が開発した血球分化系を拡張して、機能的な単球、マクロファージ、樹状細胞を作製する分化系を確立した。また、新たなスキャフォールドを用いた 3 次元培養法を確立した。PET 線維で補強したコラーゲンスポンジを基材として用いることにより、従来の血球系と異なり、細胞クラスターでなく単一細胞を播種して血球分化を開始することが可能となった。また、この系には、長期間の培養が可能になり、電子顕微鏡による解析では、ニッシュ細胞と血球細胞が 3 次元スキャフォールド上でニッシュを構築していることが明らかになった。また、慢性関節リウマチ患者 5 名からの iPS 細胞樹立を行った。

A. 研究目的

人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPS 細胞) は、京都大学の山中らによって開発された細胞で、ヒト体細胞から誘導され、ES 細胞と同様の多分化能を有する。

リウマチ性疾患では、自然免疫担当細胞が疾患形成に果たす役割は大きい。患者由来の血球細胞を用いた検討は、病気の活動性や治療薬による影響を受けやすいことから、問題が多い。

患者由来 iPS 細胞を使用して、一定の条件下で分化させた免疫細胞同士を比較することにより、より精密な病態解析が行えることが期待できる。これらの目的のためには、iPS 細胞より多くの血球系細胞を安定して確保することが必要であるが、従来の方法では限界があった。

そこで、我々は、分担研究として、iPS 細胞から単球系細胞を樹立する系を構築すること、及び慢性関節リウマチ (RA) 患者由来 iPS 細胞を樹立することを目的とした。

B. 研究方法

我々が開発したヒト iPS 細胞からの血球分化系 (Niwa et al., PLOS one, 2011) を応用して、この系から単球を樹立することを試みた。確立した分化系を用いて、マクロファージ・樹状細胞の機能評価を行った。

また、新規培養系として、コラーゲンスポンジ (CS) を用いた 3 次元培養系の構築も試みた。ヒト ES/iPS 細胞コロニーをコラゲナーゼで解離し、非接着培養用に処理した培養皿で浮遊培養を行う。基礎培地としては主に臍帯血の *ex vivo* 増幅に用いられる無血清培地を用いる。サイトカインは主に ES/iPS 細胞の中胚葉分化に VEGF、造血分化に SCF, TPO, FL, IL3, EPO を用い、それらの濃度と投与期間を変えて検討した。3 次元スキャフォールドとして、PET 繊維補強コラーゲンスポンジ (PETcol-24W) を MedGEL CO., LTD から購入して使用した。

iPS 細胞の樹立については、血液または皮膚線維芽細胞より、エピソーマルベクターを用

いて行った。

(倫理面での配慮)

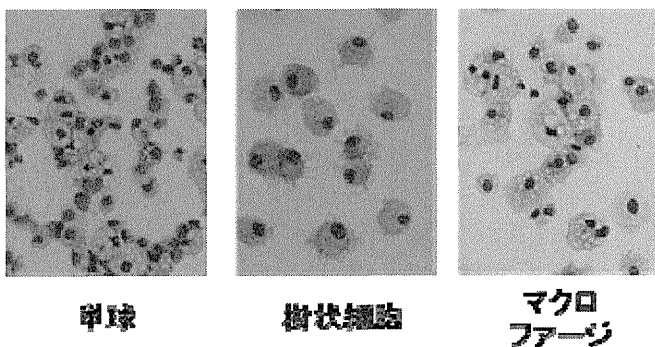
尚、iPS細胞に関する本研究における患児の遺伝子情報の取り扱いに際しては、“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”及び文部科学省研究振興局長通知に定める細則に沿って、京都大学医の倫理委員会の審査承認を受けている(実施責任者:中畑龍俊、当初承認日:平成20年6月4日、変更・追加承認日:平成24年7月19日)が、人権及び利益の保護について、十分配慮しながら実験を行った。患者からの疾患関連iPS細胞作製にあたり、「ヒト疾患特異的iPS細胞の作製とそれを用いた疾患解析に関する研究」について、京都大学医の倫理委員会の承認を頂いている(実施責任者:中畑龍俊、当初承認日:平成20年6月4日、変更・追加承認日:平成24年7月19日)。

C. 研究結果

サイトカインの種類とタイミングを調節することにより、複数のiPS細胞株から安定して単球を誘導する系を確立することに成功した。この系はFeeder細胞と血清に依存せず安定した収量の単球を得ることができることから、多数の患者由来の単球を扱う疾患解析に好適であると考えられた。

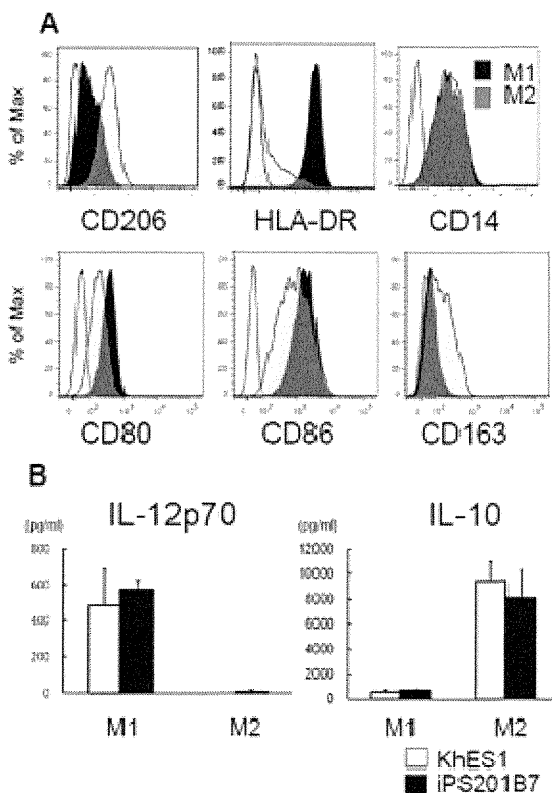
分化した単球は、CD14陽性で炎症性サイトカインを産生し、ケモアトラクタントに対する遊走能を示した。OVA抗原取り込み能も保持していた。

ヒトiPS細胞から誘導した 単球系細胞



また、この単球を樹状細胞・マクロファージへ分化させることができた。分化させた樹状細胞は、成熟に伴ってNaïve T細胞への抗原提示能が亢進したため、機能的にも成熟しているものと考えられた。

さらに単球系細胞分化系の評価として、クローン数を増やして検討したが、5クローンのヒトiPS/ES細胞株から安定して誘導可能であった。また、単球系の純度は一貫して60-90%程度であり、細胞純化を行わずに機能評価が可能であった。分化した単球をマクロファージに分化させ、さらにM1/M2マクロファージへと分極させることが可能か検討したところ、マクロファージは刺激に対してM1/M2それぞれに一致するサイトカイン分泌能を示した。したがって、ヒト多能性幹細胞から誘導したマクロファージは適切な刺激により分極が可能であることが判明した。

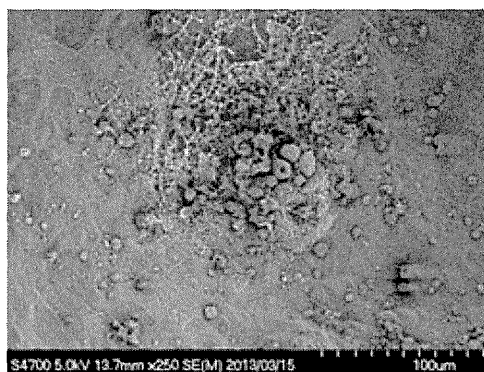


また、三次元培養系については、最初に、我々が以前に開発した二次元・マトリゲル上の血球分化系(以下2D-MG系)を応用して、CS上の血球分化を行えるかを検討した。すると、

従来の方法と同様に、Day 6 の flow cytometry では、KDR+CD34+の中胚葉系の血球前駆細胞と考えられる分画が生じていた。その割合は、クローン毎に様々であったが、2D-MG 法と同程度であった。

次に、上述の造血前駆細胞分画から各種血球細胞を得るために幾つかのサイトカインの組み合わせを用いて血球分化を行った。概ね day 20 頃からスポンジから浮遊細胞の出現が顕著になり、well の底に溜まっていく。これらの細胞は、スポンジを取り出して残りの培養上清を遠心することにより簡単かつ繰り返し回収することができる。得られた血球細胞の細胞表面マーカーと形態を観察すると、サイトカインカクテルの組み合わせにより、好中球系細胞、単球系細胞あるいは赤芽球系細胞を作り分けることが可能であった。中胚葉・血球分化系は共培養や胚様体形成が必要で、Single-cell に分離した状態からフィーダーフリーで血球分化させるのは困難である。しかし、分化能の定量化や手技の簡略化のためには、Single cell にしたPSCから分化が行えることが望ましい。そこで、接着している iPS 細胞を単一細胞に解離してCS に撒いて分化が可能かを検討した。この場合も、Day 6 の flow cytometry では、KDR low~+ CD34+の分画が出現していた。さらに、Day 20 頃からCS から浮遊細胞が遊離しており、これらは CD43+CD45+の血球系細胞であることが確認された。CS の内部構造を確認するため、走査電顕でCSを観察したところ、一部で、円柱あるいは扁平上皮が細胞集簇して平面を形成し、その一部から球形の細胞が敷石状に萌出している部分を認めた。また、PET 繊維に円形の細胞が集団を形成している部分を認めた。

疾患特異的 iPS 細胞樹立については、5名の患者より皮膚線維芽細胞あるいは血液を採取し、iPS 細胞樹立を行った。



ニッシュ細胞上の 血球様細胞

D. 考察

以上のように患者特異的 iPS 細胞の解析に有用な単球系細胞の分化系の構築に成功した。本法で作製した単球系細胞は形態学的やサイトカイン産生能について、プライマリ血球細胞に類似していた。一方、樹状細胞のHLA-DR 発現はプライマリ単球より誘導した樹状細胞より低く、アロ T 細胞の刺激能も低かった。概ね良好な分化系を樹立したと考えているが、さらなる検討が必要である。

さらに、3次元スキャフォールドを用いた多能性幹細胞からの血球分化系を開発した。この系では、ニッシュを構成する基質と細胞が一塊となって形成され、血球分化を支持しているように見える。この分化系は、従来の2D-MG系などに比べて長期間維持が可能であることや、ニッシュと血球系前駆細胞を一塊として可搬性のある基材上で誘導できることから、複数のCSを浮遊培養に持ち込むことにより大量の血球細胞を継続的に得ることが可能になるかもしれない。また、ニッシュと血球系前駆細胞を一塊として免疫不全マウスに移植するという応用も考えられる。もちろん現時点ではニッシュの機能は不十分ではあるものの、今後改善を重ねて、系を改良することにより、より有用な系が開発できるものと期待される。

E. 結論

慢性関節リウマチの解析や移植実験に有用な、新たな多能性幹細胞からの分化誘導系を開発することができた。iPS細胞研究の骨子になるのは安定した分化系の構築であり、この成果を生かし研究を進めてゆきたい。樹立した疾患特異的 iPS 細胞をこれらの系を用いて自然免疫担当細胞へ誘導し、機能解析を行うことにより、新たな治療法開発へつながることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Morishima T., Watanabe K., Niwa A., Fujino H., Matsubara H., Adachi S., Suemori H., Nakahata T., Heike T.: Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *J. Cell. Physiol.* 226(5):1283-1291,2011.
2. Heike T., Saito M., Nishikomori R., Yasumi T., Nakahata T.: Autoinflammatory diseases-a new entity of inflammation. *Inflammation and Regeneration* 31:125-136, 2011.
3. Yamanaka Y., Kitano A., Takao K., Prasansuklab A., Mushiroda T., Yamazaki K., Kumada T., Shibata M., Takaoka Y., Awaya T., Kato T., Nakahata T., Heike T.: Inactivation of fibroblast growth factor binding protein 3 causes anxiety-related behaviors. *Mol. Cell. Neurosci.* 46:200-212,2011.
4. Kamio T., Ito E., Ohara A., Kosaka Y., Tsuchida M., Yagasaki H., Mugishima H., Yabe H., Morimoto A., Ohga S., Muramatsu H., Hama A., Kaneko T., Nagasawa M., Kikuta A., Osugi Y., Bessho F., Nakahata T., Tsukimoto I., Kojima S.: Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica* 96: 814-819, 2011.
5. Yoshida N., Yagasaki H., Hama A., Takahashi Y., Kosaka Y., Kobayashi R., Yabe H., Kaneko T., Tsuchida M., Ohara A., Nakahata T., Kojima S.: Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica* 96: 771-774, 2011.
6. Kawagoe S., Higuchi T., Xing-Li M., Shimada Y., Dhimizu H., Fukuda T., Chang H., Nakahata T., Fukada S., Ida H., Ohashi T., Eto Y.: Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells derived from a murine model of Pompe disease and differentiation of Pompe-iPS cells into skeletal muscle cells. *Mol. Genet. Metab.* 104: 123-128, 2011. doi:10.1016/j.yimgme.2011.05.020.
7. Niwa A., Heike T., Umeda K., Oshima K., Kato I., Sakai H., Suemori H., Nakahata T., Saito M.: A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS ONE* 2011;6(7):e22261.
8. Murata Y., Yasumi T., Shirakawa R., Izawa K., Sakai H., Abe J., Tanaka N., Kawai T., Oshima K., Saito M., Nishikomori R., Ohara O., Ishii E., Nakahata T., Horiuchi H., Heike T.: Rapid diagnosis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHL3) by flow cytometric detection of intraplatelet Munc 13-4 protein. *Blood* 118: 1225-1230, 2011.
9. Tanaka N., Nishikomori R., Saito M., Izawa K., Sakuma M., Morimoto T., Kambe N., Watanabe S., Oshima K., Ohara O., Goldbach-Mansky R., Aksentijevich I., Arostegui J.I., Yague Jm Joost F., van Gijn M.E., SaintBasile G., Pontillo A., Kawai T., Yasumi T., Nakahata T., Horiuchi H., Heike T.: High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome patients; the results of an international multicenter collaborative study. *Arthritis Rheum.* 63:3625-3632,2011.
10. Sakai H., Okafuji I., Nishikomori R., Abe J., Izawa K., Kambe N., Yasumi T., Nakahata T., Heike T.: The CD40-CD40L axis and INF-g play critical roles in Langerhans giant cell formation. *Int. Immunol.* 24(1):5-15,2012.
11. Izawa K., Hijikata A., Tanaka N., Kawai T., Saito M.K., Goldbach-Mansky R., Aksentijevich I., Yasumi T., Nakahata T., Heike T., Nishikomori R., Ohara O.:

- Detection of base substitution–type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing. *DNA Res.* 19(2):143-152,2012..
12. Kawai T., Nishikomori R., Izawa K., Murata Y., Tanaka N., Sakai H., Saito M., Yasumi T., Takaoka Y., Nakahata T., Mizukami T., Nunoi H., Kiyohara Y., Yoden A., Mutara T., Sasaki S., Ito E., Akutagawa H., Kawai T., Imai C., Okada S., Kobayashi M., Heike T.: Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency. *Blood* 119(23):5458-66,2012.
 13. Tsumura M., Okada S., Sakai H., Yasunaga S., Ohtsubo M., Murata T., Obata H., Yasumi T., Kong X., Abhyankar A., Heike T., Nakahata T., Nishikomori R., Al-Muhsen S., Boisson-Dupuis S., Casanova J., AlZahrani M., Shehri MA., ElGhazali G., Takihara Y., Kobayashi M.: Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Human Mutation* 33(9):1377-87, 2012
 14. Tanaka T., Takahashi K., Yamane M., Tomida S., Nakamura S., Oshima K., Niwa A., Nishikomori R., Kambe N., Hara H., Mitsuyama M., Morone N., Heuse J.E., Yamamoto T., Watanabe A., Sato-Otsubo A., Ozawa S., Asaka I., Heike T., Yamanaka S., Nakahata T., Saito M.K.: Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood* 120(6):1299-308,2012.
 15. Kawai T., Saito M., Nishikomori R., Yasumi T., Izawa K., Murakami T., Okamoto N., Mori Y., Nakagawa N., Imai K., Nonoyama S., Wada T., Yatie A., Oomori K., Nakahata T., Heike T.: Multiple reversions of an IL2RG mutation restore combined immunodeficiency patient. *J. Clin. Immunol.* 32(4):690-7, 2012.
 16. Nakazawa Y., Saito S., Yanagisawa R., Suzuki T., Toshiro Ito T., Ishida F., Muramatsu H., Matsumoto K., Kato K., Ishida H., Umeda K., Souichi Adachi S., Nakahata T., Koike K.: Recipient seropositivity for adenovirus type 11 is a highly predictive factor for the development of AdV11-induced hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 48:737-739, 2013.
 17. Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK: Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell- free conditions. *PLoS ONE.* 2013; 8(4): e59243. doi:10.1371/journal.pone.0059243
 18. Kodera Y, Yamamoto K, Harada M, Morishima Y, Dohy H, Asano S, Ikeda Y, Nakahata T, Imamura M, Kawa K, Kato S, Tanimoto M, Kanda Y, Tanosaki R, Shiobara S, Kim SW, Nagafuji K, Hino M, Miyamura K, Suzuki R, Hamajima N, Fukushima M, Tamakoshi A; for the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation, Halter J, Schmitz N, Niederwieser D, Gratwohl A.: PBSC collection from family donors in Japan: a prospective survey. *Bone Marrow Transplant.* 2013 Sep 30. doi: 10.1038/bmt.2013.147. in press.
 19. Morishima T, Watanabe KI, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T.: Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica.* ; 99(1):19-27. 2014.

2.学会発表

1. 中畑龍俊：公開講演、iPS 細胞を用いた今後の医療。第 60 回日本医学検査学会(市民公開講座) 2011 年 6 月 6 日 東京国際フォーラム
2. 中畑龍俊：教育講演、疾患特異的 iPS 細胞を用いた今後の医療。第 28 回日本医学学会総会 2011 年 9 月 18 日,東京国際

- 展示場,東京.
3. Nakahata T.: Various clinical applications of human induced pluripotent stem cells. (Keynote Lecture) 2011 International Symposium on Recent Advances in Pluripotent Stem Cells & 7th Annual Meeting of Taiwan Society for Stem Cell Research, Oct. 1, 2011, Taipei Medical University, Taiwan.
 4. Yanagimachi M., Niwa A., Tanaka T., Oshima K., Saito M., Nakahata T.: Differentiation of monocytic lineage cells from human iPS cells by using a serum and feeder free culture method. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
 5. Niwa A., Saito M., Oshima K., Yanagimachi M., Tanaka T., Kato I., Nakahata T.: Human ESC/iPSC-derived mesenchymal stroma can support hematopoietic progenitors. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
 6. Morishima T., Watanabe K., Niwa A., Tanaka T., Saida S., Kato I., Umeda K., Hiramatsu H., Matsubara K., Adachi S., Nakahata T., Heike T.: Induced pluripotent stem cell model of severe congenital neutropenia with HAX1 gene deficiency. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
 7. Yokoyama K., Ikeya M., Nasu A., Tanaka T., Saito M., Umeda K., Nishikomori R., Nakahata T., Heike T., Toguchida J.: Understanding the pathology of the arthropathy in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome by using iPS cells technology. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
 8. Tanaka T., Saito M., Takahashi K., Yamanaka S., Nakahata T.: Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
 9. 田中孝之、斎藤潤、西小森隆太、平家俊男、中畑龍俊：患者特異的 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群細胞モザイクでの病態の再現と解析. 第 114 回日本小児科学会学術集会 2011 年 8 月 14 日 グラントプリンスホテル新高輪,東京.
 10. 田中尚子、井澤和司、斎藤潤、作間未織、大嶋宏一、小原収、西小森隆太、森本剛、中畑龍俊、平家俊男：NLRP3 体細胞モザイクは CINCA 症候群の 25%以上に認められる. 第 114 回日本小児科学会学術集会 2011 年 8 月 13 日,グラントプリンスホテル新高輪,東京.
 11. 中畑龍俊：iPS 細胞研究の今、その可能性と将来展望. 第 115 回日本小児科学会学術集会 2012 年 4 月 20 日, 福岡国際会議場 福岡市.
 12. 中畑龍俊：特別講演、iPS 細胞研究の進展. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会 2012 年 11 月 30 日 国立京都国際会館,京都.
 13. 中畑龍俊：教育講演、小児患者における iPS 細胞の応用. 第 49 回日本小児アレルギー学会 2012 年 9 月 16 日 大阪国際会議場,大阪.
 14. Suzuki N., Hira A., Niwa A., Saito M., Matsuo K., Nakahata T., Takata M., Yabe M.: Mesodermal development from reprogrammed Fanconi anemia cells is affected by ALDH2 enzymatic activity. 54th Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 8-11, 2012, Atlanta.
 15. 井澤和司、土方敦司、西小森隆太、小原収、田中尚子、河合朋樹、八角高裕、斎藤潤、中畑龍俊、平家俊男：次世代シーケンサーによる NLRP3 体制モザイクの診断. 第 115 回日本小児科学会学術集会 2012 年 4 月 20-22 日 (21 日) 福岡国際会議場 福岡市.
 16. 井澤和司、西小森隆太、吉岡耕平、斎藤

潤、中畑龍俊、平家俊男：CINCA 症候群における NLRP3 体細胞モザイク変異。第 33 回日本炎症・再生医学会 2012 年 7 月 5-6 日（5 日） ホテル日航福岡,福岡。

17. 中畑龍俊：iPS 細胞研究が切り開く未来の医療。日本学術会議公開学術講演会「未来社会を築く生命科学と医療のフロンティア」2013 年 8 月 3 日 京都大学薬学部記念講堂,京都。

18. 中畑龍俊：iPS 細胞の臨床応用：患者さんから樹立する iPS 細胞を用いた難病の病態解析と創薬。東京医科大学医学総合研究所シンポジウムイノベーションシリーズ Vol.3『免疫難病に対する挑戦ーバイオ医薬品から iPS 細胞の応用へ』2013 年 9 月 11 日 東京医科大学病院 6 階臨床講堂,東京。

19. 中畑龍俊：特別講演、iPS 細胞の小児医療への応用。第 38 回東日本小児科学会 2013 年 11 月 23 日 大宮ソニックシティ,大宮

20. 中畑龍俊：教育講演、iPS 細胞の臨床応用。第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会。2013 年 11 月 29 日 30 日, ヒルトン福岡シーホーク,福岡。

21. 中畑龍俊：iPS 細胞を活用した医療の可能性と倫理。第 10 回 STS フォーラム「科学技術が拓く人間の未来」公開シンポジウム 2013 年 10 月 5 日 京都商工会議所ビル講堂,京都。

22. 横山宏司、西小森隆太、池谷真、那須輝、田中孝之、齋藤潤、梅田雄嗣、中畑龍俊、戸口田淳也、平家俊男：罹患者由来 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群における関節病態の分子機構の解明。第 34 回日本炎症・再生医学会 2013 年 7 月 2-3 日 国立京都国際会館,京都。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
特になし。

2. 実用新案登録
特になし。

3. その他
特になし。

骨細胞ネットワークによる骨量調節機構に関する研究

研究分担者 小守壽文 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授
研究協力者 森石武史 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 助教

研究要旨

BCL2 を骨芽細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウスでは、骨細胞突起の数が減少し、骨細管が著減、4ヶ月齢では75%の骨細胞が死滅し、骨細胞ネットワークが破綻することを見いだした。骨形成は促進、骨吸収は低下しており、骨細胞ネットワークは、生理的条件下では、骨芽細胞機能を低下させ骨形成を抑制、破骨細胞分化・活性を促進させ骨吸収を促進させることが明らかとなった。さらに、非荷重時には、骨細胞ネットワークは、骨細胞によるスクロースチン発現誘導により骨形成を抑制するとともに、骨芽細胞での Rankl 発現誘導により破骨細胞分化・活性を促進させ、骨吸収を増加、骨量を減少させることが明らかとなった。これにより骨細胞ネットワークは、メカニカルストレスの感知・応答システムであることが証明された。尾部懸垂により後肢を非荷重状態にした野生型マウスと BCL2 トランスジェニックマウスをマイクロレイ解析で比較、非荷重を感知した骨細胞ネットワークが、骨芽細胞および骨細胞に Pdk4、Fkbp5 を発現誘導することを見いだした。Pdk4 ノックアウトマウスでは、非荷重時の骨吸収の亢進による骨量減少が起こらなかった。Pdk4 は骨芽細胞で RANKL 発現を誘導、破骨細胞形成、さらに骨吸収に導いていた。また、骨髄細胞も非荷重時に Pdk4 発現を上昇させ、破骨細胞形成に関与していた。Fkbp5 のノックアウトマウスでは、非荷重時に野生型マウスより強い骨量減少を認めた。また、Fkbp5 のノックアウトマウスは、グルココルチコイドに高い感受性を示し、強い骨量減少を認めた。Fkbp5 はグルココルチコイドの作用を調節するだけでなく、非荷重時の骨量減少にも関与することが示唆された。

A. 研究目的

骨形成と骨吸収はカップリングし、バランスが保たれているが、様々な非荷重状態では、骨形成は抑制され、骨吸収が亢進し、骨量が減少する。骨細胞は骨の中でお互いの突起および突起が通る骨細管で連絡している。さらに骨細胞はその突起と骨細管を介して骨表面の骨芽細胞と連絡し、骨全体にネットワークを形成している。骨細胞ネットワークは、その構造からメカニカルストレスを感知、骨芽細胞・破骨細胞にシグ

ナルを伝達し、骨量を調節していると推定されている。しかし、骨細胞機能を解明するためのモデルマウスが存在せず、これまで、その機能は証明されていない。今回、骨細胞ネットワークが骨量調節を行っていることを証明するとともに、その分子メカニズムを明らかにすることを本研究目的とした。

B. 研究方法

2.3 kb Colla1 プロモーターを用いて BCL2 を骨芽細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウスを作製した。マイクロ CT で骨量を野生型マウスと比較、骨組織形態計測で、骨形成、骨吸収パラメーターを測定した。銀染色で骨細管を観察するとともに、透過型電子顕微鏡および走査型電子顕微鏡で骨細胞の形態および突起構造を観察した。骨芽細胞の増殖を BrdU ラベルで、骨細胞死の頻度を TUNEL 染色で計測した。アポトーシス関連遺伝子の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法で、蛋白レベルを Western blot 法で検討した。4ヶ月齢の BCL2 トランスジェニックマウスと野生型マウスで、1週間の尾部懸垂により後肢に非荷重状態を作り、骨量を比較するとともに、非荷重時に骨芽細胞分画あるいは骨細胞分画に誘導される遺伝子をマイクロアレイで比較した。野生型マウスで誘導され、骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは誘導されない遺伝子を探索した。リアルタイム RT-PCR 法により確認し、骨細胞ネットワークにより調節される遺伝子を同定した。さらに、同定した Pdk4 および Fkbp5 のノックアウトマウスを作製した。マイクロ CT、骨組織形態計測、リアルタイム RT-PCR にてコントロール群と非荷重群を野生型マウスとノックアウトマウスで比較した。グルココルチコイド投与実験は、1.25mg/kg/day あるいは 3.2mg/kg/day 用量のプレドニゾンペレットを4週間皮下に植え込む方法、あるいはデキサメタゾン (2mg/kg/day、5mg/kg/day、10mg/kg/day) を1日1回4週間注射投与にて行った。in vitro の破骨細胞形成実験は、骨髄細胞を M-CSF と RANKL 存在下で培養する方法と、骨芽細胞と骨髄細胞の共培養の2つの方法で行った。レポーターアッセイで RANKL promoter 活性を検討した。Glucocorticoid receptor (GR)、Androgen receptor (AR)、Prolactin receptor (PR)、estrogen receptor α (ER α)、estrogen

receptor β (ER β) のレポーターベクターを用い、野生型および Fkbp5 のノックアウトマウスの初期培養骨芽細胞でレポーターアッセイを行った。初期培養骨芽細胞の骨芽細胞分化をアルカリホスファターゼ染色で比較するとともに real time RT-PCR で骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を検討した。

C. 研究結果

10週齢の BCL2 トランスジェニックマウスの骨量は野生型と差を認めなかった。BCL2 トランスジェニックマウスと野生型マウスの頭蓋冠由来細胞を用いて骨芽細胞分化を比較したが、BCL2 トランスジェニックマウス由来骨芽細胞で分化が遅れていた。逆に Bcl2 ノックアウトマウスでは、in vivo、in vitro ともに骨芽細胞分化が進んでいた。また、BCL2 トランスジェニックマウスと野生型マウスの頭蓋冠由来細胞と骨髄細胞を共培養し、破骨細胞分化を比較したが、差を認めなかった。したがって、BCL2 トランスジェニックマウスの骨芽細胞は、その分化能においては軽度低下、破骨細胞支持能においては野生型と同レベルであると考えられた。トランスジーン発現レベルは2週齢で最も高く、以後漸減、4ヶ月齢以降は低いレベルで推移した。成長過程で BCL2 トランスジェニックマウスの骨細胞は、アポトーシスで徐々に死滅していった。TUNEL 陽性細胞の頻度は、5-6週齢で20%、10週齢で50%、4ヶ月齢で75%と最大に達し、8ヶ月齢では、リモデリングにより50%に低下した。骨細管染色、透過型電子顕微鏡および走査型電子顕微鏡観察で、骨細胞突起が著減していた。骨細胞死は、この骨細胞突起の減少に起因すると考えられた。4ヶ月齢では、完全に骨細胞ネットワークは破綻していた。マイクロ CT 解析で、BCL2 トランスジェニックマウスの骨幹部皮質骨の厚さは、10週齢から4ヶ月齢にかけて有意に上昇、4ヶ月齢で骨形成率および血中オステオカル

シンの上昇を見た。破骨細胞数は2週齢で増加、6週齢移行は低下しており、血中TRAP5bも4ヶ月齢で低下していた。すなわち、4ヶ月齢の骨細胞ネットワークが破綻したBCL2トランスジェニックマウスでは、骨形成が増加、骨吸収が減少していた。すなわち、骨細胞ネットワークは、これまで言われてきたように骨形成を促進し、骨吸収を抑制するのではなく、骨形成を抑制、骨吸収を促進させる機能を持っていた。

さらに、骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは、野生型マウスで見られる非荷重時の骨量減少が起こらなかつた。野生型マウスでは、非荷重時に主に破骨細胞形成の促進により、一部骨芽細胞の機能低下により骨量が減少していたが、骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは、破骨細胞形成の促進も骨芽細胞の機能低下も認められなかつた。非荷重時には、野生型マウスでは、限局した部位で、骨細胞でのスクレロステチンの発現が増加していたが、骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは、認められなかつた。野生型マウスでは、非荷重時に骨芽細胞にRANKLが発現誘導されていたが、骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは、その発現誘導が見られなかつた。

野生型マウスで誘導され、骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは誘導されない遺伝子をマイクロアレイで探索、pyruvate dehydrogenase kinase 4 (Pdk4) およびFkbp5を同定した。PdkはPdk1, 2, 3, 4からなるが、Pdk4のみが、非荷重時に骨芽細胞、骨細胞、骨髄細胞に発現誘導された。Pdk4ノックアウトマウスは、生理的条件下では異常を認めなかつた。しかし、野生型に見られる非荷重時の骨量減少がPdk4ノックアウトマウスでは見られなかつた。さらに、野生型マウスに見られる非荷重時の破骨細胞形成促進が、Pdk4ノックアウトマウス

スでは見られなかつた。in vitroの破骨細胞形成実験では、Pdk4^{-/-}骨髄細胞の破骨細胞への分化が阻害されていた。また、Pdk4^{-/-}骨芽細胞と野生型骨髄細胞との共培養での破骨細胞形成も阻害されていた。さらに、Pdk4^{-/-}骨芽細胞ではRANKL発現、RANKL promoter活性ともに低下していた。Pdk4の過剰発現は、Rank1発現、RANKL promoter活性、破骨細胞形成とともに促進させた。

Fkbp5ノックアウトマウスの骨量をマイクロCTで比較したところ、雌での骨量低下傾向を認めたが、有意な低下ではなかつた。尾部懸垂すると、Fkbp5ノックアウトマウスでより強い骨量減少を認めた。特に雌での骨量減少が強かつた。Fkbp5は、グルココルチコイドレセプターと結合し、グルココルチコイドレセプターの核移行を抑制することが報告されている。高用量のプレドニゾロンペレット(3.2mg/kg/day)では、全例のFkbp5ノックアウトマウスが死亡した。低用量のプレドニゾロンペレット(1.25mg/kg/day)では、Fkbp5ノックアウトマウスで、より強い骨量減少を認めた。特に雌での骨量減少が強かつた。デキサメタゾンの連日注射でも、高用量で、雌のFkbp5ノックアウトマウスに多数の死亡例が観察された。やはり、Fkbp5ノックアウトマウスで、より強い骨量減少を認め、特に雌での骨量減少が強かつた。また、野生型マウスでは、グルココルチコイド投与早期に、Fkbp5 mRNAの上昇を認めた。レポーターアッセイでは、GRのレポーター活性がFkbp5ノックアウトマウス由来骨芽細胞で活性が上昇していた。Fkbp5ノックアウトマウス由来の骨芽細胞は、野生型マウス由来の骨芽細胞と比較し、より低濃度のグルココルチコイドで骨芽細胞分化が阻害された。

D. 考察

BCL2 トランスジェニックマウスでは骨細胞死を起こしても骨吸収の増加が認められず、逆に低下していた。これは、骨細胞死が必ず骨吸収を惹起するというこれまでの観察に反していた。BCL2 トランスジェニックマウスでは、骨細胞突起が減少し、骨細胞突起が通る骨細管も当然減少していた。骨細胞は骨基質内に存在するため、アポトーシスを起こしてもマクロファージによって貪食されない。したがって、結局細胞膜は破綻し二次性ネクローシスを起こす。ネクローシスを起こすと、骨細管を通過して、HMGB1, S100, HSP, ATP, 尿酸等の炎症惹起分子は骨髄腔に排出されマクロファージを活性化、TNF- α , IL-6, IL1 等の破骨細胞分化活性化因子が放出され、破骨細胞による骨吸収が始まると考えられる。しかし、BCL2 トランスジェニックマウスでは、骨細管が著明に減少していたため、二次性ネクローシスを起こしても炎症惹起分子は骨髄腔に排出されず、破骨細胞分化の亢進及び骨吸収が起こらなかったと考えられた。したがって、これまで、骨細胞死によって骨吸収が起きていた現象を、骨細胞が破骨細胞および骨吸収を抑制しているためと考えられてきたが、これは誤りで、骨吸収は骨細胞のネクローシスによって引き起こされていたと考えられる。骨細胞の機能としては、これまでの考えと逆に、破骨細胞分化・活性を刺激していると考えられる。骨形成に関しても、これまでの考えと異なり、骨細胞は骨芽細胞の活性を抑制、骨形成を抑制していると考えられる。非荷重状態にすると、破骨細胞数が増加、骨形成が低下するが、骨細胞は、骨芽細胞での RANKL 発現を誘導し破骨細胞分化・活性を増強、骨吸収を促進させ、骨細胞におけるスクレロスタチンの発現を誘導、Wnt シグナルを阻害し骨芽

細胞の機能を低下させると考えられる。

Pdk4 は、PDC(pyruvate dehydrogenase complex)をリン酸化、PDC の機能を抑制し、糖代謝でのエネルギー産生を抑制する酵素である。飢餓状態で主に筋肉に発現誘導されることが報告されてきた。我々は、非荷重状態を骨細胞ネットワークが感知し、骨細胞および骨芽細胞でPdk4を発現誘導することを明らかにした。また、Pdk4 は RANKL を骨芽細胞に発現誘導し、破骨細胞分化を誘導することを明らかにした。しかし、Pdk4 による PDC リン酸化を阻害する DCA(dichloroacetate)の添加や PDC を脱リン酸化する Pdp1(pyruvate dehydrogenase phosphatase)の過剰発現は、破骨細胞形成や Rank1 発現に影響しなかった。したがって、Pdk4 は、PDC のリン酸化を介さずに、破骨細胞形成や Rank1 発現を誘導すると考えられた。骨細胞ネットワークが Pdk4 発現を誘導する機序および Pdk4 が RANKL 発現を誘導する機序は不明であり、今後明らかにしていかなければならない。

非荷重による骨量減少は、Fkbp5 ノックアウトマウスでより強く認められた。非荷重ストレスは、血中コルチゾールを増加させ、骨量減少を引き起こす可能性がある。しかし、血中コルチゾールは、野生型マウスでは非荷重時に増加したが、ノックアウトマウスでは増加しなかった。したがって、Fkbp5 ノックアウトマウスでは、非荷重時の骨量減少の増強に、グルココルチコイドレセプターシグナル以外の経路が関与したと考えられる。Fkbp5 ノックアウトマウスは、グルココルチコイドに対する感受性が高く、強い骨量減少を認めたが、特に雌で顕著であり、性差があることが示唆された。Fkbp5 ノックアウトマウスは、ステロイド性骨粗鬆症の病態解明のモデルマウスとなると考えられた。

E. 結論

これまで、骨細胞死によって骨吸収が惹起されるのは、骨細胞が破骨細胞を抑制するためと考えられてきたが、これは、骨細胞の二次性ネクロシスによって起こることであり、骨細胞は本来、破骨細胞を活性化、骨芽細胞機能を抑制していることが明らかになった。また、骨細胞ネットワークはメカニカルストレスを感受、応答するシステムであることが証明された。さらに、骨細胞ネットワークの機能は非荷重状態ではさらに増強され、骨芽細胞における RANKL 誘導を介した破骨細胞分化・活性化の促進、骨細胞におけるスクレロスタチン誘導による骨芽細胞機能の抑制により、骨量減少を引き起こすことが明らかとなった。さらに、非荷重を感知した骨細胞ネットワークは、骨芽細胞に Pdk4 を誘導、Pdk4 は RANKL 発現を誘導し、破骨細胞形成、さらに骨吸収に導いていた。また、骨髄細胞も非荷重時に Pdk4 発現を上昇させ、破骨細胞形成に関与していた。また、Fkbp5 はグルココルチコイドの作用を調節するだけでなく、非荷重時の骨量減少にも関与することが示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Cao L, Moriishi T, Miyazaki T, Iimura T, Hamagaki M, Nakane A, Tamamura Y, Komori T, Yamaguchi A. Comparative morphology of the osteocyte lacunocanalicular system in various vertebrates. *J Bone Miner Metab.* 29(6) : 662-70, 2011.
2. Moriishi T, Maruyama Z, Fukuyama R, Ito M, Miyazaki T, Kitaura H, Ohnishi H, Furuichi T, Kawai Y, Masuyama R, Komori H, Takada K, Kawaguchi H, Komori T. Overexpression of bcl2 in osteoblasts inhibits osteoblast differentiation and

induces osteocyte apoptosis. *PLoS One.* 6(11) : e27487, 2011.

3. Wang Y, Liu W, Masuyama R, Fukuyama R, Ito M, Zhang Q, Komori H, Murakami T, Moriishi T, Miyazaki T, Kitazawa R, Yoshida CA, Kawai Y, Izumi S, Komori T. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 induces bone loss at unloading by promoting osteoclastogenesis. *Bone.* 50(1) : 409-19, 2012.
4. Moriishi T, Fukuyama R, Ito M, Miyazaki T, Maeno T, Kawai Y, Komori H, Komori T. Osteocyte network; a negative regulatory system for bone mass augmented by the induction of Rankl in osteoblasts and Sost in osteocytes at unloading. *PLoS One.* 7(6) : e40143, 2012.
5. Komori T. Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass. *Cell Tissue Res.* 352(2) : 191-8, 2013
6. Moriishi T, Kawai Y, Komori H, Rokutanda S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Asahina I, Komori T. Bcl2 Deficiency Activates FoxO through Akt Inactivation and Accelerates Osteoblast Differentiation. *PLoS One.* 9(1) : e86629, 2014.

2. 学会発表

1. Regulation of bone mass at unloaded condition by osteocyte network. Komori T. *Bio-Rheumatology International Congress in Tokyo /2011*
2. Osteocyte network and mechanical stress. Komori T. 第 22 回国際リウマチシンポジウム /2013
3. Osteocytes, Coordinator of the Bone. Komori T. 2013 Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism /2013
4. 骨細胞ネットワークによるメカニカルストレス応答 小守壽文. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会 /2013